doi 10.3969/j.issn.1674-4500.2017.01.33

技术方法

肺癌肿瘤标志物神经元特异性烯醇化酶抗原适配子的筛选及其应用

赵运旺,朱家宁
西北师范大学化学化工学院,甘肃 兰州 730070

摘要:目的 提出一种基于适配子快速检测肺癌肿瘤标志物的方法。**方法** 利用指数级富集配体的系统进化技术筛选其高特异性适配子,通过流式细胞术检测亲和力,最终选出一条高亲和力、强特异性的适配子。枸橼酸钠还原法制备纳米金颗粒。建立基于免标记纳米金和适配子的分析方法,并对其方法进行考察。**结果** 通过6轮筛选得到三条NSE的高特异性、强亲和力的适配子,其中,a适配子特异性最高。同时利用筛选得到的肺癌肿瘤标志物a适配子和纳米金颗粒建立一种快速检测NSE抗原的方法。**结论** 该方法具有较好的准确度,为肺癌的早期检测提供了一种新的手段。

关键词: 神经元特异性烯醇化酶抗原;适配子;纳米金;肺癌;肿瘤标志物

An aptamer-based analytical method for rapid detection of lung cancer tumor markers NSE antigen

ZHAO Yunwang, ZHU Jianing
College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To explore a new aptamer-based rapid detection method for lung cancer tumor markers. **Methods** Highly specific adaptive were screened by using systematic evolution of ligands (SELEX) and affinity were detected by flow cytometry. So as to choose a high affinity and high specificity of aptamer. Gold nanoparticles were prepared through sodium citrate reduction. The method based on label-free analysis of gold nanoparticles and aptamers were established, with methodological investigation. **Results** High specificity and strong affinity of 3 NSE were obtained through 6 rounds of screening, with highest specificity of a. A rapid method for the detection of NSE antigen were established through the selection of tumor markers of lung cancer and gold nanoparticles. **Conclusion** The method has a good accuracy for the early detection of lung cancer provides a new means.

Key words: NSE antigen; aptamers; nanometer gold; lung cancer; tumor markers

肺癌是目前世界范围内致死率最高的恶性肿瘤之一,严重威胁着人类的生命健康。大部分患者就诊时已经是肺癌中晚期,从而导致失去了最佳的治疗时机。肺癌患者的5年生存率极低,仅有5%~10%[1]。因此,早期诊断对提高肺癌病人生存率尤为关键。目前临床上采用肺癌血清肿瘤标志物联合检测的诊断手段,提高了肺癌诊断的准确性、灵敏度[2]。目前,常见的肺癌血清肿瘤标志物有:神经元特异性烯醇化酶(NSE)、癌胚抗原、细胞角蛋白19片段等[3]。其中NSE已经证明可以作为肺癌早期检测的判断指标。

适配子是一种具有高亲和力、强特异性的识别靶标的单链DNA或RNA[4],与蛋白质结合的适配子因其单链核酸的碱基序列多样性及结构多样性,可通过形成发卡、茎环、G-四链体等二级/三级结构与蛋白质靶标的空间结构匹配,形成与靶分子高亲和力和强特异性结合。其具有优于传统抗体的诸多优点,例如:作用的靶分子范围广泛,无免疫原性,稳定性好,易于修饰等,因而可以代替抗体应用于临床检测和治疗[5-7]。因此选用NSE抗原作为靶标分子,主要依赖于传统的SELEX技术,本实验采取的消减SELEX技术是一种改良后的SELEX技术,主要原理为SELEX筛选时去除与非特异性靶标分子结合的寡核苷酸序列,然后将消减后的寡核苷酸序列与目标靶分子结合进行正筛。筛选得到高特异性、强亲和力的NSE抗原适配子,利用该适配子和纳米金颗粒建立了一种快速检测肺癌肿瘤标志物NSE抗原的方法。为肺癌的早期诊断提供一种新的检测方法。

收稿日期:2016-09-13
基金项目:国家自然科学基金(81360333)
作者简介:赵运旺,硕士,E-mail: 1021357025@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料

ssDNA 文库:5'-GCAATGGTACGGTACTTCC-N30-CAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3',上游

引物：5'-GCAATGGTACGGTACTTCC-3'，下游引物：5'-CAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'，带生物素的下游引物：Bio-5'-CAAAAGTGCACGCTACTTT-GCTAA-3'，ssDNA文库和引物由英骏生物技术有限公司合成。

试剂：NSE抗原（2 mg/mL），NSE抗体（2 mg/mL）购自Sigma，磁珠、链霉亲和素磁珠购自Promega，实时定量PCR试剂盒购自TOYOBO，PBS购自上海生工。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 NSE抗原适配子的筛选

1.2.1 NSE抗原与磁珠结合　将1×10^{6}磁珠，加入0.1 mol/L碳二亚胺EDC，0.1 mol/L N-N-羟基琥珀酰亚胺NHS各1 mL，室温下活化30 min。PBS洗3遍，将活化好的磁珠平均分成两份，分别标记为“+”、“-”，将1 μL NSE抗原与标记有“+”的磁珠混合，37 ℃震荡2 h，PBS洗3遍，4 ℃保存备用。1 μL NSE抗体与标记有“-”的磁珠混合，与NSE抗原方法一致。

1.2.2 NSE抗原适配子筛选　取100 pmol的ssDNA文库，用PBS稀释到1 mL，充分混匀，95 ℃、10 min及4 ℃、10 min。将预处理好的ssDNA文库与NSE抗体-磁珠复合物孵育，37 ℃震荡1 h，分离磁珠，回收上清，将上清与NSE抗原-磁珠复合物孵育，37 ℃震荡1 h。PBS洗磁珠，加入200 μL纯水，95 ℃加热5 min，回收上清。

1.2.3 RT-PCR扩增富集　取180 μL RT-PCR反应体系各加入1 μL上游引物和带生物素的下游引物，加入18 μL ssDNA模板10 μL，充分混匀，20 μL/管分装，进行RT-PCR扩增，扩增到S型曲线最高点停止扩增。

1.2.4 ssDNA次级库的制备　将RT-PCR扩增产物与偶联链霉亲和素磁珠，37 ℃，孵育45 min，在碱性条件下变性得到ssDNA，用于下一步的筛选。

1.2.5 RT-PCR实时检测筛选进程　将每轮筛选得到的次级ssDNA文库与NSE抗原-磁珠复合物，37 ℃孵育30 min，PBS洗涤3遍，RT-PCR检测特异性NSE抗原ss-DNA富集的变化。

1.2.6 克隆与测序　将第6轮富集的ssDNA次级文库用不带生物素的引物扩增成dsDNA。将1 μL PCR扩增产物与1 μL T载体混匀，37 ℃反应5 min。将连接后的产物与50 μL Trans-T感受态细胞充分混匀，冰浴30 min。42 ℃热激30 s，立即置于冰上2 min。取200 μL菌液涂板，培养12 h。挑取边缘光滑的白色单克隆至0.5 mL含氨苄和卡纳霉素的培养基中，过夜培养。挑选阳性克隆团，送公司测序。

1.2.7 NSE抗原适配子的亲和力检测　10 μL NSE抗原包被微孔板，4 ℃过夜。将标记有FITC的适配子a、b、c稀释为不同的浓度，分别加入到NSE抗原包被的96孔板中，37 ℃，孵育1 h。洗去不能结合NSE抗原的非特异性ssDNA，荧光仪测测定其荧光值，激发波长460 nm，发射波长520 nm[8]。同时每组设置平行实验。与NSE抗原结合的特异性的ssDNA的量可以通过测定荧光值的大小，同时参考其标准曲线来获得，根据计算得到的NSE抗原ssDNA的量进行非线性回归，分析得到NSE抗原适配子的解离常数（K_d）值。

1.2.8 适配子与肺癌血清特异性结合检测　取1×10^{6}磁珠，平均分成两份，分别标记为“+”“-”，200 μL肺癌血清与标记有“+”的磁珠混合，200 μL正常人血清与标记有“-”的磁珠混合，37 ℃震荡1 h，PBS洗3遍，在“+”、“-”中分别加入FITC标记的a适配子100 μL，室温振荡30 min，PBS洗3遍。用流式细胞术分析磁珠表面的荧光强度。

1.2.9 NSE抗原适配子二级结构的分析模拟　使用DNAMAN软件，分析模拟NSE抗原适配子的二级结构。

1.3 快速检测肺癌肿瘤标志物NSE纳米金-适配子检测体系的建立

纳米金颗粒是用氯金酸的柠檬酸还原法制得[9]。将NSE抗原适配子用PBS稀释成0.1 mmol/L，向酶标板中各加入50 μL的适配子溶液，然后加入不同浓度的NSE抗原，37 ℃孵育30 min，加入50 μL的纳米金颗粒溶液，37 ℃，孵育30 min，再加入50 mmol/L的NaCl溶液混匀，进行光谱分析，绘制得到对应的纳米金-适配子检测体系的标准曲线。取浓度为1600、200、12.5 nmol/L的溶液用上述方法分别测定，一次实验中每个浓度分别设置3份重复，并设置不含NSE抗原的空白对照。按照上述方法分别检测A700和A520，计算出A700/A520的数值，最后以A700/A520的均值与3倍标准差的和代入相应的标准曲线计算出浓度，即可得到检出限[10-12]。

2 结果

2.1 筛选富集过程

经过6轮SELEX筛选富集后（图1），通过RT-PCR检测，在第4轮时，检测到与NSE抗原-磁珠复合物结合的ssDNA明显地比与NSE抗体-磁珠复合物结合的ssDNA多，说明与NSE抗原结合的适配子已经富集，直到第6轮筛选，适配体富集已经达到饱和。

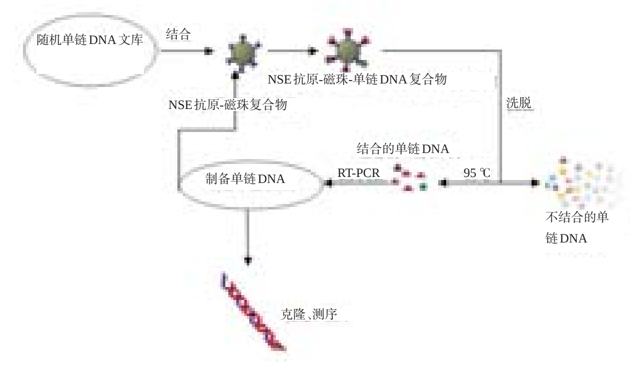


图1 SELEX技术筛选流程

2.2 NSE抗原适配子测序结果

第6轮筛选得到的ssDNA文库,经纯化、连接、转化到Trans-T感受态细胞中,培养获得单克隆菌落。经测序获得3条适配子序列(表1)。

表1 适配子测序序列

序列号	大小(bp)	序列	K_d(mmol/L)
a	30	CGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG	21±8
b	29	CAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC	30±5
c	30	TAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGC	33±4

2.3 适配子与NSE抗原结合的特异性考察

对a、b、c三个适配子进行亲和力检测,结果如图2所示,在一定的范围内,测定的荧光值与三条适配子的浓度呈正比关系,这也说明筛选得到的3条NSE抗原适配子都与NSE抗原具有较高的亲和力。经过计算,3条适配子的K_d值都达到了纳摩尔级,适配子a与NSE抗原的亲和力最强。

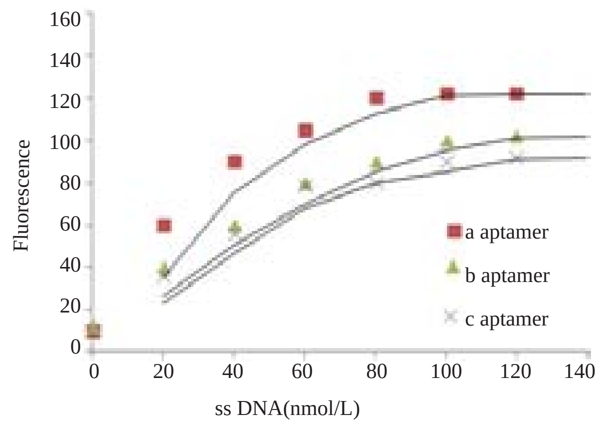


图2 适配子亲和力检测结果

2.4 适配子二级结构预测

根据DNAman软件分析模拟适配子的二级结构可知,筛选得到的这3条适配子的二级结构为茎环和口袋结构,环主要为凸环和圆环(图3)。适配子的特异性二级结构决定了其与NSE抗原结合的方式。

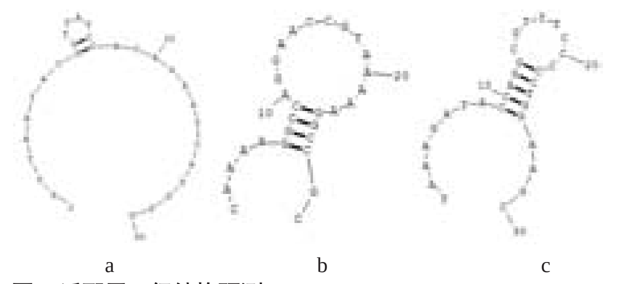


图3 适配子二级结构预测

2.5 NSE抗原适配子与肺癌血清结合的特异性考察

NSE抗原适配子与肺癌血清结合的特异性考察结果显示,a适配子与正常人血清结合明显弱于与肺癌血清的结合(图4)。

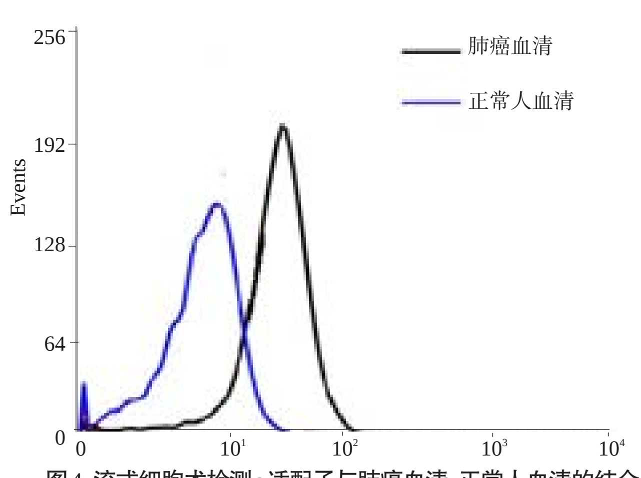


图4 流式细胞术检测a适配子与肺癌血清、正常人血清的结合

2.6 纳米金颗粒-适配子检测体系的建立

当适配子的浓度在12.5~600 nmol/L时,适配子浓度的对数与A700/A520呈负相关,线性方程是$y=-0.542x+1.899$,$R^2=0.9896$,其中y表示A700/A520,x表示浓度的对数(图5)。

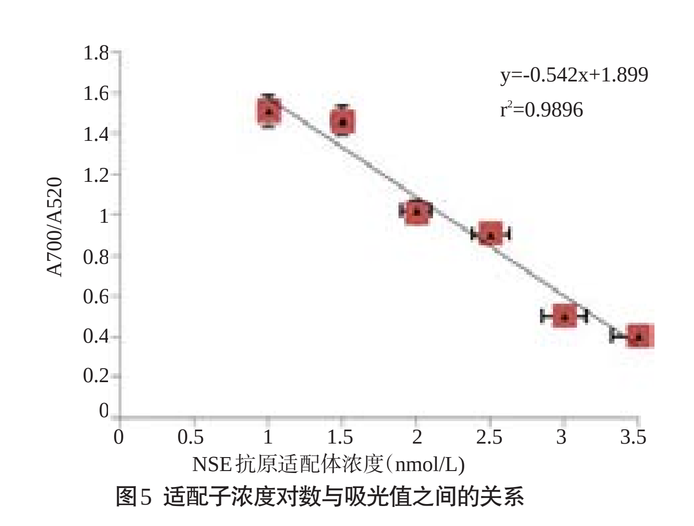


图5 适配子浓度对数与吸光值之间的关系

3 讨论

适配子是一类大小为70~80 bp左右的寡核苷酸分子,可以与靶标分子高亲和力、强特异性地结合,在一定的情况下,还可能发挥某些生物学效应。因为适配子具有靶分子范围广、相对分子质量小、无免疫原性、易于人工合成、修饰和标记等优点,适配子在临床诊断、基础研

究,甚至在疾病治疗领域中都显现其重要的应用价值。因此适配子能够成为最具前景的抗体替代品。ssDNA文库可以形成发夹、假结、凸环和G-四分体等空间结构,然后与靶分子稳定地结合,通过筛选和富集,最终获得高亲和力、高特异性的寡核苷酸序列。1990年Tuerk等[13]最早通过经典SELEX技术筛选到噬菌体T4 DNA聚合酶的RNA适配子。Fang等[14]利用合成的DNA适配子与荧光淬灭方法可以高通量地检测和区分体液中不同种类的蛋白质。NSE抗原是肺癌肿瘤标志物之一,而本研究则利用消减SELEX技术,以磁珠为筛选介质,通过6轮快速筛选得到适配子,并利用该适配子和纳米金颗粒建立了一种快速检测肺癌肿瘤标志物的方法。该实验过程耗时不足40 min,同时免去ELISA中的反复洗板过程,成为本研究最大亮点。

消减SELEX筛选是个循序渐进的过程,每轮筛选效率的高低决定了筛选轮数的多少。本研究在前几轮的筛选中,投入较高量的NSE抗原与ssDNA文库孵育,使ssDNA文库中能与NSE抗原特异性结合的ssDNA尽可能多的保留。在后续的筛选中,当特异性结合的ssDNA通过RT-PCR扩增得到富集,随着筛选轮数的增加,逐渐减少NSE抗原的投入量,从而增加ssDNA与NSE抗原之间结合的竞争力,从而提高了筛选效率,使特异性结合的ssDNA快速富集。同时为了提高筛选的特异性,增加了反筛。通过RT-PCR检测筛选进程,发现第4轮适配子已经开始富集,经过6轮筛选,适配体富集已经达到饱和。

利用DNAMAN软件分析模拟适配子的二级结构显示,筛选得到的适配子结构主要以茎环口袋为主,这可能是NSE抗原与适配子结合的结构基础。通过测定每个适配子的亲和0力,结果显示a适配子与NSE抗原的亲和力最高,大口袋小茎环结构的适配子与NSE抗原的结合最紧密。

由于纳米金颗粒具有独特的生物化学性质和生物相容性,当适配子结合到纳米金的表面,使其表面带有高密度的负电荷,这样即使在高浓度的盐溶液中纳米金颗粒仍然是保持分散状态[15-17]。当待测血样中有NSE抗原时,适配子-NSE抗原复合物形成,适配子折叠形成稳定的高级结构。这样在一定浓度的盐溶液中,纳米金聚集,溶液颜色由红色变为蓝色。利用这一反应原理,本研究设计出一种能够快速检测肺癌肿瘤标志物NSE的方法,并得到了适配子浓度对数与吸光值之间的关系。为肺癌的早期检测提供了一种新的分子生物学方法。同时也有利于进一步研究各适配体与肺癌肿瘤标志物NSE的亲和力和结合位点。

参考文献:

[1] Cai D, Xu D, Zhang Q, et al. Classification of lung cancer using ensemble-based feature selection and machine learning methods[J]. Molecular biolystems, 2014, 464(7291): 1071-6.
[2] 杜淑英. 血清5种肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 北方药学, 2014, 11(9): 85-6.
[3] 时广利, 胡秀玲, 岳思东, 等. 血清肿瘤标志物在肺癌辅助诊断中的应用[J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(5): 299-301.
[4] Mckeague M, Mcconnell EM, Cruztoledo TJ, et al. Analysis of in vitro aptamer selection parameters[J]. J Mole Evol, 2015,81(5): 150-61.
[5] Liu K, Lin B, Lan X. Aptamers: a promising tool for cancer imaging, diagnosis, and therapy.[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(2): 250-5.
[6] Darmostuk M, Rimpelová S, Gbelcova H, et al. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. [J]. Biotechnol Adv, 2015, 33(6): 1141-61.
[7] Chen X, Zhang J, Nilsen HM. Fe-g-C3N4-Catalyzed oxidation of benzene to phenol using hydrogen peroxide and visible light[J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(33): 12018-24.
[8] 陈伶利, 李 杰, 张晓青, 等. 以大肠埃希菌tolC蛋白为靶标的适配体的筛选及结构分析[J]. 北京大学学报: 医学版, 2014, 46(5): 698-702.
[9] Fletcher J, Phillips W, Milligan S, et al. Toward specific detection of dengue virus serotypes using a novel modular biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 26(4): 1696-700.
[10] Biroccio A, Hamm J, Incitti I, et al. Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase[J]. J Virol, 2002, 76(8): 3688-96.
[11] Zhou J, Shu Y, Guo P, et al. Dual functional RNA nanoparticles-gp120 aptamer for cell-type specific delivery and HIV-1 inhibition[J]. Mrthods, 2011, 54(2): 284-94.
[12] Wheeler A, Trifonova R, Vrbanac V, et al. Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras[J]. J Clin Invest, 2011, 121(6): 2401-12.
[13] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(4968): 505-10.
[14] Fang XH, Sen A, Vicens M, et al. Synthetic DNA aptamers to detect protein molecular variants in a high-throughput fluorescence quenching assay[J]. Chembiochem, 2003, 4(9): 829-34.
[15] Jeon H, Kayhan B, Ben YT, et al. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin[J]. J Biol Chem, 2004, 279(46): 48410-9.
[16] Misono S, Kumar K. Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance[J]. Anal Biochem, 2005, 342(2): 312-7.
[17] Gopinath C, Misono S, Kawasaki K, et al. An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion[J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt 3): 479-87.